

JOSÉLI MARIA BÜCHELE

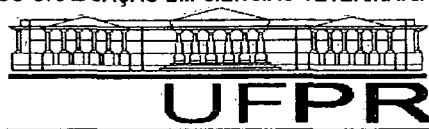
**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO
UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS
DE CONSERVAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss

CURITIBA

2002



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **JOSÉLI MARIA BÜCHELE** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“Criopreservação de sêmen canino utilizando diferentes meios de conservação”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito "**A**" concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 04 de março de 2002.


Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS
Presidente/Orientador


Prof. Dr. RUDIGER DANIEL OLLHOFF
Membro


Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Membro

Dedico este trabalho aos meus pais, Arthur e Sibeles, que sempre se esforçaram para me mostrar o melhor caminho a percorrer para alcançar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que tem me proporcionado na vida.

À minha família, especialmente minhas mães Sibeles e Senair, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem.

Ao Allan, pelo amor e carinho dedicados nos momentos bons e ruins.

Ao professor e orientador Romildo Romualdo Weiss pela grande confiança depositada em mim ao longo do curso e pela dedicação e amizade demonstrados não apenas na minha formação profissional mas também pessoal.

Ao Sr. Carlos Pedrosa, pela paciência e disponibilidade em ceder os cães, espaço e funcionários do Canil Três Pinheiros para este experimento.

A todos os colegas, professores e funcionários do Hospital Veterinário da UFPR que contribuíram de alguma maneira para a realização deste experimento.

Ao curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, em especial ao Francisco, pela sua dedicação ao curso e pelas dicas.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante o período do Mestrado.

À amiga Adriane Haenisch Woehl, que me mostrou o caminho da reprodução de animais.

À médica veterinária Regina Bueno, por todas as idéias e palavras que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas e companheiras de trabalho Vanessa Saito, Juliana de Souza e Carla Yoko Tanikawa, que tornaram o nosso trabalho ainda mais estimulante e alegre.

Aos animais, em especial aos cães deste experimento Andrew, Tornado e Man.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 ETAPAS DO PROCESSAMENTO DO SÊMEN.....	3
2.1.1 Avaliação do sêmen.....	3
2.1.2 Diluição do sêmen.....	5
2.1.3 Componentes do meio diluidor.....	6
2.1.4 Centrifugação do sêmen.....	11
2.1.5 Período de equilíbrio do sêmen.....	11
2.1.6 Criopreservação do sêmen.....	12
2.1.7 Descongelação do sêmen.....	13
2.2 MÉTODOS DE ANÁLISE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO.....	15
2.2.1 Análise <i>in vivo</i> da qualidade espermática no sêmen criopreservado.....	16
2.2.2 Análise <i>in vitro</i> da qualidade espermática.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.2 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	26
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	36
5.1 MOTILIDADE PROGRESSIVA.....	36
5.2 PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS.....	37
5.3 TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA.....	38
5.3.1 Motilidade espermática.....	38
5.3.2 Integridade de acrossoma.....	40
5.4 VARIAÇÃO INDIVIDUAL.....	40
5.5 VARIAÇÃO ENTRE OS MEIOS DILUIDORES.....	41
6 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DILUIDORES TRIS-GEMA-EQUEX E TRIS-LEITE	25
TABELA 2 -	CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DOS CÃES DA RAÇA DACHSHUND, UTILIZADOS COMO DOADORES DE SÊMEN.....	27
TABELA 3 -	VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (%) EM SÊMEN CANINO DILUIDO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E RESFRIAMENTO.....	28
TABELA 4 -	VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (%) EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E DURANTE O TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA	29
TABELA 5 -	VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, DA PATOLOGIA ESPERMÁTICA PRIMÁRIA EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA	30
TABELA 6 -	VALORES MÉDIOS DE PATOLOGIA ESPERMÁTICA SECUNDÁRIA EM SÊMEN CANINO FRESCO NÃO DILUIDO E EM AMOSTRAS DILUÍDAS, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA	30
TABELA 7 -	VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, DA PATOLOGIA ESPERMÁTICA SECUNDÁRIA EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA	31
TABELA 8 -	VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, REFENTES À INTEGRIDADE DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA	33
TABELA 9 -	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA MOTILIDADE PROGRESSIVA EM AMOSTRAS DE SÊMEN CANINO, APÓS DILUIÇÃO, CENTRIFUGAÇÃO E RESFRIAMENTO.....	34
TABELA 10 -	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA MOTILIDADE PROGRESSIVA EM SÊMEN CANINO PÓS-DESCONGELAMENTO	35
TABELA 11 -	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO PÓS-DESCONGELAMENTO.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- - MOTILIDADE PROGRESSIVA (%) IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E DURANTE O TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA EM SÊMEN CANINO DILUIDO.....	29
FIGURA 2- - EDEMA SEVERO DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO APÓS DESCONGELAMENTO	32
FIGURA 3 - DELOCAMENTO TOTAL DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO APÓS DESCONGELAMENTO	32

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de dois meios diluidores na crioconservação do sêmen canino, considerando os efeitos desses sobre a qualidade espermática *in vitro*, após o descongelamento. Os meios diluidores testados foram Tris-leite e o Tris-gema-Equex. Foram utilizados três machos, submetidos a colheitas semanais, durante seis semanas, totalizando dezoito amostras em cada delineamento experimental. Os testes *in vitro* aplicados às amostras de sêmen foram avaliação da motilidade espermática progressiva; avaliação da integridade da célula espermática e do acrossoma, através de análise em microscopia de contraste de fase; e avaliação da longevidade espermática, por meio do teste de termo-resistência. A análise comparativa entre os meios diluidores evidenciou que não houve diferença entre os meios após a diluição, entretanto o diluidor Tris-gema-Equex apresentou valores de motilidade progressiva superiores ($p < 0,05$) ao diluidor Tris-leite logo após o resfriamento, após o descongelamento e durante o teste de termo-resistência. A avaliação da integridade celular também revelou valores maiores de células intactas após o descongelamento e ao final do teste de termo-resistência nas amostras diluídas com Tris-gema-Equex.

Palavras-chave: sêmen, cão, congelamento

ABSTRACT

The main purpose of this study was to evaluate the use of two extenders in the criopreservation of canine semen, considering the effects of those about the sperm quality *in vitro*. The studied were Tris-milk and Tris-yolk-Equex. It was used three dogs, collected once a week, during six weeks. The *in vitro* evaluations applied to the semen samples were sperm motility and forward progression; sperm cell and acrosome integrity through phase contrast microscopy and sperm longevity through the thermo resistance test. The comparative analysis between the extenders showed that there was no difference between the extenders after dilution, however the extender Tris-yolk-Equex showed increased values ($p<0,05$) of the progressive motility when compared to extender Tris-milk right after cooling, frozen, thawing and during the thermo resistance test. The cell integrity evaluation also revealed better results from the intact cell after thawing and in the end of the thermo resistance test in the diluted samples with Tris-yolk-Equex.

Keywords: semen, dog, criopreservation

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen canino visa sua utilização em inseminação artificial e o armazenamento de material de alto valor genético por tempo indeterminado.

Devido à alta diversidade de raças na espécie canina, a crioconservação do sêmen, associada à técnica de inseminação artificial, tornou-se um procedimento importante para a preservação das características genéticas e fenotípicas dessas raças.

A técnica de congelamento permite a conservação de linhagens de alto valor, principalmente dos machos que, sabidamente, mantêm em sua progênie, características desejáveis, proporcionando um prolongamento da vida reprodutiva do macho, fato esse desejado por muitos proprietários e criadores. Pode-se citar ainda, a preservação de espécies de canídeos silvestres, que estão sob estudo ou em risco de extinção.

Entre as inúmeras as razões para a utilização do sêmen canino congelado, as mais citadas são: possibilidade de transporte do sêmen para longas distâncias e o seu armazenamento por tempo indeterminado, levando a uma diminuição dos gastos com transporte do animal e seu desgaste as com viagens, o que pode refletir negativamente na eficiência reprodutiva do animal.

A inseminação artificial tem sido realizada na espécie canina há muito tempo, sendo que o primeiro registro data do século XVIII, por Spalanzani em 1776 (MIES FILHO, 1982) porém, a criopreservação do sêmen canino foi realizada, pela primeira vez e de forma experimental, na metade do século passado.

A primeira congelamento de sêmen de cão realizada com sucesso, foi descrita por ROWSON (1954). Já os primeiros relatos de inseminação artificial, que resultaram em prenhez em cadelas, com o uso de sêmen congelado, foram realizados por SEAGER em 1969. Porém, as taxas de prenhez obtidas foram em torno de 10%.

Após esse resultado, outros trabalhos foram conduzidos, para adaptação da melhor técnica para a congelação de sêmen em caninos.

Até os dias atuais, a utilização do sêmen criopreservado, nessa espécie, não está amplamente difundida e a maior razão para isso ainda é os resultados insatisfatórios das taxas de prenhez e número de filhotes.

No entanto, na última década houve maior interesse na inseminação artificial e na criopreservação do sêmen na espécie canina. Assim, tornou-se fundamental ampliar os conhecimentos sobre as características do sêmen canino, manipulação adequada do sêmen após a colheita e o processo de criopreservação. Técnicas para o congelamento de sêmen canino precisam ser aperfeiçoadas para maximizar a taxa de gestação e aumentar o número de doses para inseminação obtidas de um único ejaculado. Para melhorar estas técnicas, investigações simultâneas de diferentes aspectos do processo de criopreservação devem ser realizadas a fim de encontrar a melhor combinação entre diluentes, crioprotetores e a congelamento.

O objetivo deste trabalho foi observar e comparar os efeitos de diluentes contendo leite desnatado ou gema de ovo e sódio dodecil sulfato¹, sobre a motilidade espermática e a integridade do acrossoma, durante a criopreservação.

¹ Sódio dodecil sulfato (Equex STM Paste®).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A crioconservação de sêmen de cão visa o armazenamento de material genético por um período de tempo ilimitado, possibilitando a transmissão de características de animais de alto valor genético, através de gerações e mesmo após a morte do animal.

São várias as razões para a utilização do sêmen congelado, como a possibilidade de transporte desse sêmen por longas distâncias, o que acarretaria em diminuição de gastos com o transporte do animal e diminuição do desgaste do animal durante o transporte (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1989).

MORTON (1986), cita também a preservação de espécies de canídeos silvestres, que estão sob estudo ou em risco de extinção.

O primeiro sucesso no resfriamento de sêmen de cão foi alcançado por HARROP (1956), quando após 6 dias de transporte obteve gestação em uma das seis cadelas inseminadas. Alguns anos mais tarde SEAGER (1969), relatou sucesso na inseminação usando sêmen congelado, porém com taxas de prenhez em torno de 10%. Desde então inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas a fim de investigar e descobrir novas técnicas de conservação e a obtenção de taxas de concepção satisfatórias.

2.1 ETAPAS DO PROCESSAMENTO DO SÊMEN

2.1.1 Avaliação do sêmen

A avaliação do sêmen é classicamente realizada considerando-se os aspectos macroscópicos, microscópicos e físicos (SILVA, 2001).

A avaliação do sêmen destinado à criopreservação é geralmente realizada apenas na segunda fração espermática ou fração rica em espermatozóides. Mas embora seja apenas esta a fração de interesse, pela presença das células espermáticas, deve-se estar atento para alterações na fração prostática, pois qualquer modificação pode interferir com o desempenho reprodutivo do cão (JONHSTON et al., 2000).

O ejaculado canino pode ser facilmente fracionado durante o procedimento de colheita, de acordo com a mudança das frações do ejaculado (GILL et al., 1970).

Volume, coloração, viscosidade e aspecto do sêmen são os parâmetros macroscópicos avaliados. Um ejaculado tem aspecto normal quando possui viscosidade leitosa e coloração branca (SILVA, 2001).

A primeira fração, de origem prostática e coloração transparente, tem o volume variando de algumas gotas até 2ml (ENGLAND et al., 1990). A segunda fração, de origem testicular e rica em espermatozóides, possui aspecto turvo, leitoso, e volume variando entre 0,2 e 4ml (PURSWELL et al., 1992). A terceira fração, também de origem prostática, deve ser transparente e seu volume pode chegar até 30ml (SILVA, 2001).

Microscopicamente, avalia-se a motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

A motilidade diz respeito ao percentual de espermatozóides móveis numa amostra, enquanto vigor refere-se à força de deslocamento, em uma escala de 0 a 5, onde 0 significa espermatozóides sem motilidade e 5, espermatozóides com deslocamento rápido e contínua progressão para adiante (SEAGER e PLATZ, 1977b). Para determinação desses parâmetros o método mais usual, porém menos preciso, é o da avaliação subjetiva em microscopia ótica, com aumento de 100 a 400x, à temperatura de 37°C. Uma avaliação mais objetiva da motilidade pode ser feita através da análise computadorizada assistida do sêmen, mas seu uso ainda é restrito entre os pesquisadores (ELLINGTON et al., 1993; GÜNZEL-APEL et al., 1993).

A concentração espermática pode apresentar variação, tanto entre as raças,

como num mesmo animal, dependendo da frequência de utilização desse macho para reprodução. Entretanto, observa-se que a grande maioria dos cães apresenta concentrações que variam de 200 a 800 milhões de espermatozóides por mililitro de sêmen (SILVA, 2001).

Apesar da motilidade espermática ser o parâmetro mais utilizado na avaliação do sêmen, em algumas condições, pode ocorrer baixa capacidade fecundante com elevada motilidade espermática, devido a alterações principalmente no acrossoma (ENGLAND, 1993).

Alterações no acrossoma, interferindo diretamente na fertilidade do sêmen, e outras patologias espermáticas são comumente encontradas no sêmen após descongelação, entre elas, defeitos na peça intermediária e cauda enrolada ou fraturada (MORTON e BRUCE, 1989).

Segundo OETTLÉ (1993), acredita-se que a morfologia espermática esteja mais bem relacionada com a fertilidade do que com outros parâmetros.

As alterações morfológicas podem ser classificadas como primárias ou secundárias de acordo com a sua origem. Na espécie canina, o total de defeitos, entre primários e secundários, não deve ultrapassar 30%, sendo 10% defeitos primários, originados na formação da célula espermática e 20% defeitos secundários, surgidos na maturação, armazenamento, transporte ou até mesmo na manipulação do sêmen (CBRA, 1998).

2.1.2 Diluição do sêmen

A diluição do sêmen é essencial para o sucesso da técnica da criopreservação, pois os componentes dos meios diluidores fornecem condições para a sobrevivência do espermatozóide (SILVA, 2001).

A membrana plasmática é apontada por ser o local no qual as injúrias induzidas pelo congelamento iniciam (MORRIS, 1981) e o diluidor tem como função auxiliar na preservação da integridade da membrana plasmática, além de fornecer energia para o espermatozóide e estabilizar o pH do meio (LINDE-FORSBERG, 1991).

Um bom diluidor caracteriza-se pela ausência de toxicidade à célula espermática, é isotônico, tem poder nutritivo, é um tampão eficaz, além do seu pH favorecer a sobrevivência dos espermatozóides, e por último, o meio diluidor deve ser de fácil preparo e baixo custo (SILVA et al., 2000).

O sêmen é diluído para alcançar uma concentração padrão antes do congelamento. PEÑA e LINDE-FORSBERG (2000b), reportam uma concentração de $200 \times 10^6/\text{ml}$ resultando em melhor taxa de motilidade imediatamente após o descongelamento e durante o período de incubação, e ainda mantendo a adequada integridade de acrossoma.

2.1.3. Componentes do meio diluidor

Muitos diluentes têm sido estudados para a criopreservação de sêmen canino. Os diluentes à base de TRIS (tris-hidroxymethyl-aminometano) e citrato de sódio, contendo gema de ovo e uma fonte de energia, são comumente utilizados tanto em situações práticas quanto em experimentais com boas taxas de fertilidade, sob diferentes concentrações do crioprotetor glicerol (ENGLAND, 1993; FONTBONNE e BADINAND, 1993a).

O metabolismo espermático resulta na produção de íons hidrogênio, tornando o meio ácido e diminuindo a sobrevivência espermática, o que se pode notar pela diminuição da motilidade progressiva. O pH ótimo para os espermatozóides caninos está entre 6,9 e 7,1, embora a média da segunda fração do ejaculado canino

seja aproximadamente 6,5 (ENGLAND, 1993). SMITH², citado por ENGLAND (1993), demonstrou que uma melhor motilidade é mantida no sêmen congelado em pH 7,0. Os sistemas tampões devem, portanto, estar presentes nos diluentes para garantir a manutenção do pH e sobrevivência dos espermatozóides.

Vários meios tampões têm sido estudados para a preservação do sêmen canino. FOOTE e LEONARD (1964), observaram que o tampão citrato foi superior ao fosfato, para a sobrevivência dos espermatozóides. Ainda verificando os componentes dos meios diluidores, FOOTE (1964) relata que o tampão bicarbonato foi prejudicial à sobrevivência dos espermatozóides caninos.

SEAGER, em 1969, descreve um diluente contendo 11% de lactose e modificações deste foram amplamente pesquisadas e utilizadas posteriormente (SEAGER e FLETCHER, 1973; SEAGER e PLATZ, 1977a).

Os meios tampões introduzidos mais recentemente são os íons dipolares, como o Tris (Tris-hidroximetil aminometano) e o Tes (N-tris (hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico), associado ao citrato e à gema de ovo (GRAHAM et al., 1972). Após a introdução destes tampões surgiram várias modificações que têm sido amplamente empregadas até a atualidade (SILVA e VERSTEGEN, 1995; PEÑA et al., 1998a; SIRIVADYAPONG et al., 2000).

O Tris, um agente emulsificante usado em medicina humana para combater a acidose, é solúvel em água e comporta-se como uma base fraca. Dessa maneira, sua utilização no diluidor do sêmen canino previne a acidificação do meio aumenta a sobrevivência espermática (SILVA et al., 2000).

Além dos tampões, os açúcares adicionados aos diluentes possuem papel importante, atuando como substrato energético e como componente osmótico. BARTLLET (1962), estudando os constituintes bioquímicos do sêmen de cão,

² SMITH, F.O. **Cryopreservation of canine semen: technique and performance**. USA, 1984.

observou que os espermatozóides caninos obtêm energia, primariamente, de processos glicolíticos.

Macromoléculas adicionadas aos diluentes tem importância reconhecida desde que PHILLIPS e LARDY (1940), descreveram o efeito positivo da gema do ovo na preservação do sêmen bovino. Desde então, estudos têm demonstrado que as proteínas e lipídios presentes na gema do ovo e no leite desnatado aumentam a sobrevivência do espermatozóide durante a crioconservação (BRAUN et al., 1995).

A gema de ovo é o componente de origem biológica mais largamente utilizado na composição dos diluidores de sêmen de cão. Particularmente os seus componentes fosfolipídios possuem ação protetora de membranas plasmáticas (ENGLAND, 1993). Acredita-se que há uma ocupação, por parte destes lipídios, em locais específicos de superfície da membrana, substituindo os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico e tornando-as mais resistentes. Assim, lesões secundárias associadas ao congelamento podem ser prevenidas (QUINN et al., 1980; WATSON, 1995; HAMMERSTED et al., 1990).

Concentração da gema de ovo nos diluidores à base de tris para congelação do sêmen canino pode variar de 10 a 20% (FARSTAD, 1996).

BRAUN et al. (1995), relatam que diluentes contendo leite desnatado resultaram em melhores resultados de motilidade e integridade de acrossoma no congelamento do sêmen eqüino. LAGARES et al. (1999) e KENNEY et al. (1975) quando resfriaram sêmen eqüino em diferentes diluentes obtiveram melhores taxas de motilidade total no sêmen diluído em leite desnatado. É provável que isto se deva aos fosfolipídios, à caseína e à glicose, contidos nos diluentes à base de leite (PICKETT e AMANN, 1987). O diluidor contendo leite desnatado também tem sido amplamente empregado na congelação do sêmen caprino, conferindo resultados satisfatórios (MELO e NUNES, 1991).

Outro componente necessário nos meios para congelação é o agente crioprotetor.

Os crioprotetores são essenciais para a congelação da maioria dos sistemas biológicos. Esses aditivos, no entanto, não permitem a sobrevivência de 100% das células, devido aos efeitos tóxicos dos agentes sobre a célula, o que depende, principalmente, da concentração utilizada do crioprotetor (FAHY, 1986).

Os crioprotetores devem ser substâncias de baixo peso molecular e de baixa toxicidade para as células. Os mecanismos de ação desses agentes são de promover a redução gradual da concentração de eletrólitos do meio extra-celular, protegendo a célula do efeito de solução durante a congelação, possibilitar a saída gradual de água intracelular e permitir a estabilização das membranas celulares (VAN DER BERG e SOLIMAN, 1969; ALLER et al., 1995).

O glicerol, um agente crioprotetor permeável, é o mais utilizado e o que apresenta os melhores resultados na congelação do sêmen canino (ENGLAND, 1993). Segundo DOEBBLER (1966), o glicerol é classificado como um soluto que se liga fortemente aos íons hidrogênio da molécula de água, tornando mais lenta a desidratação osmótica a qual célula é submetida durante o congelamento.

A concentração ótima do glicerol varia de acordo com o diluente, com o método de congelação e com a espécie animal em questão. Em cães, a concentração varia entre 3 e 11%, pois altas concentrações podem afetar a capacidade fecundante do espermatozóide (FOOTE e LEONARD, 1964; FARSTARD, 1996). ALLER et al. (1995), afirmam que a toxicidade desse agente é dependente da temperatura do meio e com a redução da temperatura, durante a congelação, o seu efeito tóxico torna-se nulo.

FONTBONNE e BADINAND (1993b), observaram os efeitos do glicerol sobre a motilidade espermática do sêmen canino, após a descongelação, variando a concentração utilizada do agente, o método de adição e a temperatura de glicerolização. Não houve diferença na motilidade espermática quando foi empregado 3,2 e 6,4% de glicerol e na concentração de 1,6%, observou-se menor motilidade espermática.

Os mesmos autores relataram que o glicerol, adicionado ao meio em uma única etapa ou em várias e, tanto à temperatura ambiente, quanto em 5°C, não interferiu na qualidade espermática; sugerindo que a concentração mínima de glicerol, que irá conferir proteção aos espermatozóides caninos, deva estar entre 1,6 e 3,2% e que o agente pode ser adicionado ao meio diluidor à temperatura ambiente e em etapa única, o que facilita o processamento do sêmen.

PEÑA et al. (1998b) estudaram o efeito do glicerol sobre a qualidade espermática, em amostras de sêmen diluídas no meio Tris-citrato e observaram que na concentração de 8% as amostras de sêmen apresentaram melhor qualidade espermática. Enquanto ROTA et al. (1998) relatam efeitos negativos à longevidade logo após o descongelamento e durante incubação quando se faz uma redução na concentração de glicerol 5% para 3%, considerando-se parâmetros como integridade de acrossoma e longevidade do espermatozóide. ROTA (1997) observou uma melhor motilidade com 6% de glicerol adicionado ao diluente quando sódio dodecil sulfato³ for utilizado.

Componentes aditivos, como detergentes e aminoácidos, têm sido adicionados ao meio diluidor (PEÑA et al., 1998c). O detergente sódio dodecil sulfato tem sido incluído em diluentes, de diferentes espécies, e vêm demonstrando efeitos benéficos em javalis (PURSEL et al., 1978), touros (ARRIOLA e FOOTE, 1987), garanhões (MARTIN et al., 1979) e ratos (PENFOLD et al., 1993), melhorando a motilidade, integridade de acrossoma e conferindo melhores taxas de concepção tanto *in vitro* quanto *in vivo*. ROTA et al. (1997) observaram em cães o aumento na longevidade após o descongelamento, assim como uma melhora na motilidade e na integridade da membrana plasmática quando o sódio dodecil sulfato foi adicionado ao diluente.

O componente sódio dodecil sulfato, provavelmente exerce uma ação

³ Sódio dodecil sulfato, componente ativo do Equex STM Paste ®.

através da alteração da gema do ovo contida no diluente, pela solubilização de seus lipídios protetores. Embora alguns pesquisadores acreditem em efeitos positivos diretos do sódio-dodecil-sulfato na membrana plasmática, PURSEL et al. (1978) encontraram uma diminuição na motilidade e um aumento nas alterações do acrossoma de javali, quando o sódio-dodecil-sulfato foi adicionado ao meio diluente sem a presença da gema de ovo (PURSEL et al., 1978; PEÑA et al., 1998a).

2.1.4 Centrifugação do sêmen

Segundo CUNHA e LOPES (1999), os ejaculados caninos apresentam grandes oscilações de volume e concentração espermática. Torna-se, portanto, necessária à utilização de um método para amenizar tais variações e permitir a padronização do processo de congelamento do sêmen.

Alem disso, a incubação prolongada dos espermatozoides diluídos com a primeira e a terceira frações do ejaculado, pode afetar a qualidade seminal. ENGLAND e ALLEN (1992), observaram um acentuado decréscimo na motilidade espermática em amostras de sêmen incubadas com a primeira e a terceira fração. DOBRINSKI et al. (1993), também recomendam a centrifugação do sêmen, visando a separação completa entre os espermatozoides e o plasma seminal.

A centrifugação do sêmen canino tem sido utilizada como uma das etapas do processo de crioconservação, sendo citado em vários trabalhos, variando somente o tempo e a intensidade da centrifugação (OLAR et al., 1989; HAY et al., 1997; ROTA et al., 1999).

2.1.5. Período de equilíbrio do sêmen

Os espermatozóides de diversas espécies requerem um intervalo de algumas horas antes de serem congelados, o que é conseguido durante o período de resfriamento e equilíbrio do sêmen, pois, aparentemente, é neste período que as células espermáticas adquirem resistência máxima aos efeitos da congelação (ENGLAND, 1993).

Relata-se algo em torno de uma a duas horas para a queda da temperatura de 37°C para 4 ou 5°C e o mesmo período para o equilíbrio, mas segundo ENGLAND (1993), valores descritos pelos estudos são arbitrários na maioria das vezes.

OLIVEIRA et al. (1999), relataram não haver diferença estatisticamente significativa entre 1, 2, 3 e 4 hs para equilíbrio do sêmen no meio de congelação Tris-gema contendo 6% de glicerol.

2.1.6. Criopreservação do sêmen

O processo de congelação deve ser realizado em diversas etapas e requer cuidados especiais para não haver perda na qualidade do material (ENGLAND, 1993).

As taxas de congelação são cruciais para a manutenção da viabilidade celular. Se a taxa for ótima e a membrana celular for permeável à água, ela torna-se progressivamente desidratada e é funcional após a descongelação. Quando as taxas de congelação não são ótimas, a perda de viabilidade das células está relacionada a vários eventos, como diminuição do conteúdo de água intracelular, com conseqüente aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação desses solutos, levando a alterações de pH (WATSON, 1995).

O processo de criopreservação espermática representa uma interrupção artificial no progresso natural do espermatozóide até a fecundação. Mesmo as melhores técnicas atuais de preservação alcançam, em média, cerca de 50% de viabilidade celular. Além disso, a maioria dos espermatozoides viáveis possui características que os distinguem de antes da congelação (ROTA, 1998). O ciclo da criopreservação inclui o processo como um todo, desde a colheita e a diluição do sêmen, até a manutenção da capacidade funcional da célula, por um determinado período de tempo, após a descongelação (WATSON, 1995).

Foi estabelecido que cada tipo celular tem uma taxa de congelação ótima para sobreviver à criopreservação e, com relação aos espermatozoides, foram determinadas várias taxas que podem variar conforme a espécie animal em questão, o diluidor utilizado, o método de estocagem do sêmen e a concentração do crioprotetor no meio extensor (WATSON, 1995).

O sêmen canino é comumente congelado no vapor de nitrogênio líquido, por ser mais prático, demonstrar melhor custo-benefício que outras técnicas e, ainda, ter sucesso já comprovado. Porém, para melhor controle nas mudanças de temperatura e obtenção de taxas de congelação com maior repetibilidade, o emprego de um *freezer* programável é recomendado (ROTA, 1998).

Segundo ROTA et al. (1998), aparentemente, existe uma grande amplitude nas taxas de congelação que podem ser aplicadas sobre o sêmen canino. Tal fato pode explicar os resultados não consistentes sobre o assunto.

2.1.7. Descongelação do sêmen

WATSON (1995), considerando as causas das lesões celulares durante a criopreservação, observou que as células criopreservadas podem ser lesionadas durante a descongelação. Nessa etapa do processo, a célula está exposta ao fenômeno

de recristalização migratória, que é a reorganização de micro-cristais de gelo em cristais maiores, que podem lesar a membrana plasmática das células.

Se a taxa de congelação empregada for rápida (formam-se mais cristais de gelo), deve-se realizar a descongelação rápida (HAMMERSTEDT et al., 1990), para a dissolução dos cristais, antes da ocorrência da recristalização migratória, que causa grandes danos à membrana plasmática e organelas celulares. Além disso, aparentemente, os espermatozóides são mais sensíveis à entrada de água através da membrana plasmática, como ocorre na descongelação, do que à saída de água, como ocorre na congelação (WATSON, 1995).

Assim, a fase de descongelação é uma etapa tão importante quanto a congelação para a sobrevivência da célula. Os resultados obtidos com diferentes taxas de descongelação para o sêmen canino são contraditórios, indicando que deve haver diferenças entre os métodos ideais de descongelação, relacionados às várias técnicas de congelação (ROTA et al., 1998).

Os pesquisadores adotaram várias temperaturas de descongelação em seus protocolos de criopreservação do sêmen canino. A descongelação rápida (70°C por 6 a 8 segundos ou 55°C por 30 segundos) foi citada por FERGUSON et al. (1989), WILSON (1993), SILVA e VERSTEGEN (1995), HAY et al. (1997) e PEÑA et al. (1998b). Enquanto a descongelação lenta (37°C a 38°C, por 1 a 2 minutos), foi utilizada por DOBRINSKI et al. (1993) e FONTBONNE e BADINAND (1993b).

OLAR et al. (1989) observaram que a taxa de descongelação rápida (75°C por doze segundos) foi superior quanto à motilidade espermática, após a descongelação, quando comparada a taxa de 35°C por 30 segundos.

IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) utilizaram duas taxas de descongelação (37°C por 8 segundos e 55°C por 5 segundos), para o sêmen canino e relataram que, com a taxa mais rápida, a viabilidade (motilidade e longevidade) dos espermatozóides foi superior, sugerindo que o rápido aumento na temperatura tenha impedido a formação de cristais de gelo maiores dentro da célula.

Entretanto, YUBI⁴ (1984) citado por ENGLAND (1993), testou três taxas de descongelação para o sêmen de cão e encontrou maior declínio na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozóides vivos, nas amostras descongeladas através da taxa rápida (75°C por 6 segundos), que nas amostras descongeladas com a taxa lenta (37°C por 2 minutos).

2.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO

Para ser fértil, os espermatozóides devem ser capazes de expressar várias características, em uma seqüência temporal correta. Além disso, um número suficiente de espermatozóides férteis deve estar presente nas proximidades do ovócito, para a ocorrência da fecundação (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993). A inseminação artificial com o sêmen congelado, que consiste no método de análise *in vivo*, é a melhor técnica para se avaliar se os espermatozóides criopreservados mantiveram essas características e, conseqüentemente, seu potencial fértil (ENGLAND, 1993).

No entanto, as análises *in vivo* requerem um número grande de animais para serem realizadas, além disso dependem de uma variedade de fatores que vão muito além da qualidade seminal. Entre esses fatores podem ser incluídos o número de doses e o volume de sêmen ideal para realização da inseminação, bem como o número de inseminações; o local de deposição do sêmen na fêmea; o momento ideal de inseminação, considerando-se o ciclo estral e fatores individuais dos animais (FARSTAD, 1996).

Por outro lado, os métodos de análise *in vitro* podem ser empregados para avaliar algumas das características que os espermatozóides férteis detém. No entanto,

⁴ YUBI, A.C. Investigations of dog sêmen with particular reference to freezing techniques.

a previsão da capacidade fecundante de amostras de sêmen pode não ser muito precisa, somente com a utilização desses métodos de análise (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993). Quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em predizer o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado (ROTA, 1998).

2.2.1. Análise *in vivo* da qualidade espermática no sêmen criopreservado

Nos primeiros estudos em que se empregou o sêmen congelado para a inseminação artificial na espécie canina, os índices reprodutivos obtidos foram bastante baixos. GIL et al. (1970) obtiveram taxa de prenhez nula, o mesmo sendo relatado por ANDERSEN (1972), sendo que ambos os autores utilizaram amostras seminais que apresentavam cerca de 50% de motilidade após a descongelação. O último autor relatou a prenhez de uma única cadela, quando inseminada pela via intra-uterina.

SEAGER et al. (1975) apresentaram dados de estudos realizados num período de 5 anos sobre a inseminação artificial com sêmen congelado em caninos. As amostras de sêmen foram diluídas em lactose-gema-de-ovo com glicerol e a via de inseminação utilizada nas cadelas foi a intravaginal. A taxa de prenhez obtida foi de 38,7%, nas 156 cadelas incluídas no estudo, valores esses, superiores aos relatados anteriormente, porém ainda distantes do ideal.

Cerca de dez anos depois, FARSTAD (1984) relatou os resultados da inseminação artificial em 25 cadelas, com sêmen congelado. A motilidade espermática do sêmen descongelado estava entre 30 a 70% e a taxa de prenhez obtida foi de 67%, quando a inseminação foi realizada pela via intra-uterina e de 25%, quando realizada pela via intravaginal. Demonstrando assim, que o local de deposição do sêmen limita a aplicabilidade da inseminação com sêmen congelado.

Em programas mais recentes de inseminação artificial com sêmen congelado, as taxas de prenhez foram de 41,5% para 65 cadelas inseminadas pela via transcervical. Observou-se, ainda, que com a utilização de amostras de sêmen de baixa qualidade não se alcançava prenhez positiva. No entanto, quando foi utilizado sêmen de ótima qualidade e as fêmeas estavam em momento propício para a inseminação, a taxa de prenhez elevou-se para 69% (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1989).

Maiores taxas de concepção são alcançadas quando se utiliza inseminação intra-uterina aliada a um ótimo momento de inseminação. A deposição do sêmen no útero pode ser realizada por laparotomia, laparoscopia, ou por cateterização cervical, técnica que provoca o menor estresse para a fêmea, mas que requer muito treino devido à dificuldade de acessar a cérvix da cadela pela sua conformação anatômica (FONTBONNE e BADINAND, 1993a; WILSON, 1993; LINDE-FORSBERG, 1995; PEÑA et al., 1998a).

A baixa taxa de fertilidade quando se utiliza a inseminação intra-vaginal sugere que aqueles espermatozóides que sobrevivem ao congelamento e mantêm a motilidade após o descongelamento têm a sua capacidade fertilizante prejudicada, devido às alterações na membrana plasmática, incluindo alterações de acrossoma, e uma baixa longevidade no trato reprodutivo da fêmea. Devido ao curto tempo de sobrevivência do espermatozóide após o descongelamento, há a necessidade de determinar o momento ótimo para a inseminação assim como a sua deposição dentro do útero (LINDE-FORSBERG, 1995; ROTA et al., 1997; PEÑA et al., 1998; ROTA et al., 1998).

2.2.2. Análise *in vitro* da qualidade espermática

As análises *in vitro* do sêmen devem avaliar a função espermática, isto é, avaliar a célula como estando apta ou não para realizar a fecundação do ovócito, semelhante ao que seria avaliado em estudos *in vivo*. Para tal, o sêmen deve ser submetido a alguns testes específicos que avaliem, entre outras características, os seus parâmetros físicos, a integridade da membrana plasmática, do acrossoma e a longevidade do espermatozóide (ROTA, 1998).

Segundo AMANN (1989), é aceitável que aferições objetivas da motilidade espermática, condição de acrossoma e outras características do sêmen estejam, significativamente, correlacionadas com a fertilidade. Porém, os espermatozoides férteis devem manter e expressar uma série de características, que incluem desde estrutura normal de seus componentes funcionais até estabilização de seu conteúdo de DNA, passando pela manutenção da viabilidade da membrana plasmática (HAMMERSTED et al., 1990). Assim, pode-se supor que todas as características presentes em um espermatozóide fértil não são avaliadas ao mesmo tempo, nas análises *in vitro* do sêmen.

A motilidade da célula espermática e o vigor espermático são critérios importantes na avaliação da qualidade seminal, pois os espermatozoides precisam estar móveis e obterem hiper-atividade, quando na tuba uterina, para alcançar o ovócito e penetrar nas suas camadas de revestimento (AMANN, 1989). No entanto, mesmo que a estimativa subjetiva da motilidade, em um microscópio de contraste de fase, demonstre repetibilidade, com um mesmo observador, torna-se difícil comparar resultados entre diferentes laboratórios (AMANN, 1989; ROTA, 1998).

Uma avaliação mais objetiva da motilidade pode ser feita através da análise computadorizada assistida do sêmen, mas seu uso ainda é restrito entre os pesquisadores (GÜNZEL-APEL et al., 1993).

A motilidade da célula espermática e o vigor espermático foram, durante muito tempo, os únicos parâmetros empregados para a avaliação da integridade dos espermatozóides, após qualquer processamento do sêmen, como pode ser observado em diversos trabalhos (OLAR et al., 1989; DOBRINSKI et al., 1993; THOMAS et al., 1993). Porém, apesar de serem uma expressão da viabilidade espermática, seus valores também dependem do ambiente em que os espermatozóides são colocados para serem observados e nem sempre correspondem, diretamente, com a capacidade fecundante do sêmen (ROTA, 1998).

Segundo ENGLAND (1993), os espermatozóides podem apresentar motilidade espermática alta após a congelção, mas não serem férteis, devido a danos em outras estruturas, como o acrossoma, assim, se fazem necessárias outras análises do sêmen. SILVA e VERSTEGEN (1995) observaram tal fato, quando congelaram sêmen de cão e notaram que as amostras de sêmen que obtiveram motilidade mais alta, após a descongelção, não corresponderam às amostras que alcançaram as mais elevadas taxas de prenhez na IA.

A integridade da membrana plasmática e sua funcionalidade são essenciais para a viabilidade da célula, como a permeabilidade seletiva da membrana mantendo a atividade metabólica intracelular, a composição iônica e o pH. Na célula espermática, além da integridade da membrana plasmática, a integridade do acrossoma é importante para os eventos da fertilização, principalmente para a fusão da célula espermática com o oócito (ROTA et al., 1997).

Outra análise *in vitro* do sêmen, considerada imprescindível para se avaliar a qualidade espermática é a de integridade do acrossoma. Isso porque a reação acrossômica precisa estar ocorrendo em sincronismo com o momento da fecundação e se o acrossoma apresentar lesões, pode inviabilizar a reação. Após sua ocorrência é que os espermatozóides adquirem novas habilidades, como de penetração na zona pelúcida e de fundir-se com a membrana plasmática do ovócito. Como as membranas acrossomais podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen, faz-se

necessário a avaliação de sua integridade para predizer a qualidade do sêmen preservado (CROSS e MEIZEL, 1989).

OETTLÉ (1986) levantou o fato de que o melhor método para avaliar a qualidade do sêmen criopreservado, continua sendo o *in vivo*, com a observação das taxas de prenhez obtidas via inseminação artificial. No entanto, devido ao longo intervalo do ciclo estral das cadelas, a coleta desses resultados consiste em um processo prolongado. Assim, muitos métodos *in vitro* foram desenvolvidos, com intuito de predizer a fertilidade do sêmen e o mais confiável deles parece ser a análise da integridade do acrossoma.

CROSS e MEIZEL (1989) salientaram que existem diferentes métodos que podem ser empregados para a avaliação do acrossoma espermático, como microscopia de contraste de fase, colorações específicas para visualização do acrossoma, em microscopia ótica convencional e marcadores fluorescentes, sendo que cada um dos métodos apresenta fatores positivos e negativos.

A microscopia de contraste de fase permite a visualização do acrossoma, em diversas etapas da reação acrossômica e também a identificação das alterações mais comuns, que podem ocorrer durante o processamento do sêmen. Porém, na espécie canina a visualização é relativamente difícil, pelo tamanho reduzido da cabeça dos espermatozóides (CROSS e MEIZEL, 1989).

IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) relataram resultados sobre a avaliação do acrossoma em amostras de sêmen que foram submetidas a congelamento com três diferentes diluidores. A observação do acrossoma foi feita após coloração das amostras com vermelho congo e violeta genciana e a visualização em microscopia ótica convencional. Após a descongelamento, a porcentagem de acrossomas íntegros estava em torno de 47%, sendo que, inicialmente, essa era superior a 70%. Os acrossomas foram as estruturas celulares mais sensíveis à criopreservação, apresentando vários graus de edema ou estando até mesmo ausentes.

HAY et al. (1997) realizaram um estudo para determinar o melhor método

para a criopreservação do sêmen canino e, para tal, analisaram alguns parâmetros do sêmen, entre eles, a integridade do acrossoma. Utilizaram o corante comercial Spermac e observaram, em microscopia ótica convencional, que o número médio de espermatozóides, no sêmen fresco, com acrossoma íntegro foi de 95% e, após a descongelação, de 23%.

PEÑA et al. (1998a) e PEÑA et al. (1998b) avaliaram a integridade do acrossoma dos espermatozóides canino criopreservados, através de microscopia de contraste de fase. A porcentagem de acrossomas íntegros, após a criopreservação, foi de 52% e de 58%, respectivamente.

ROTA (1998) avaliou a integridade de acrossoma após a criopreservação do sêmen de cão, através da coloração com o corante comercial Spermac e observou o acrossoma em microscopia ótica convencional. Relatou-se que cerca de 45% dos espermatozóides apresentavam algum tipo de alteração secundária, representando diferentes estágios de degeneração acrossomal. Segundo o autor, mesmo que o processo de criopreservação do sêmen cause lesões secundárias no acrossoma, não se pode excluir a possibilidade de que, se essas lesões forem pequenas, os espermatozóides poderiam manter sua capacidade fecundante.

A avaliação da longevidade dos espermatozóides *in vitro* se realiza através do teste de termo-resistência. A manutenção do sêmen incubado à temperatura semelhante à corporal, que é o princípio do teste, parece ser um dos métodos mais eficientes, na aferição da qualidade espermática, após o processamento do sêmen. O objetivo do teste é mimetizar as condições em que o espermatozóide é submetido nos órgãos reprodutores femininos (ENGLAND, 1993).

O teste de termo-resistência tem sido utilizado em diversos trabalhos, como um incremento na avaliação da qualidade espermática do sêmen criopreservado. De modo geral, as amostras de sêmen são submetidas a períodos de duas a seis horas de incubação, nas temperaturas de 37°C a 39°C (OLAR et al., 1989; FONTBONNE e BADINAND, 1993; HAY et al., 1997; ROTA et al., 1997; PEÑA et al., 1998a; PEÑA

et al., 1998b; ROTA et al., 1999).

ENGLAND e ALLEN (1992), monitorando a proporção de espermatozóides móveis e viáveis, observaram que 75% da motilidade inicial haviam sido perdidas após um período de 7 horas em amostras de sêmen fresco diluídas no diluente Tes/Tris, enquanto nas amostras congeladas com o mesmo diluente a motilidade e a viabilidade decaíram em um período de 3 horas.

ROTA et al. (1997) encontraram uma diminuição na motilidade de 42% após 3h de incubação a 38° C quando o sódio ducedil sulfato foi adicionado ao diluente na concentração de 0,5%.

PEÑA et al. (1998a), estudando a longevidade do sêmen canino congelado e que foi diluído com Tris-gema de ovo e 4% de glicerol, observaram que a motilidade espermática, imediatamente após a descongelação, foi de 40,4%. Nos momentos subsequentes de observação, os valores encontrados foram de 25,4% aos 30 minutos, 21% aos 60 minutos e 13% aos 120 minutos, após a descongelação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados três cães, clinicamente sadios, com idade de dois, quatro e sete anos, da raça Dachshund, provenientes do canil Três Pinheiros⁵. Os animais foram mantidos, durante todo o procedimento experimental, sob condições normais de manejo alimentar, recebendo ração seca comercial⁶ duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Os cães foram submetidos a exame andrológico prévio, sendo analisados os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen. Após um período de adaptação de três semanas, os cães considerados aptos foram utilizados no experimento.

A colheita de sêmen foi realizada em intervalos semanais, pelo método de manipulação digital, durante os meses de abril e junho de 2001. Foram realizadas seis colheitas para cada macho, totalizando dezoito colheitas, para o procedimento experimental. As colheitas foram realizadas em ambiente apropriado e sempre no mesmo local. Para a colheita foram utilizados tubos de centrifuga, de vidro e graduados, acoplados a um funil de vidro, mantidos em temperatura ambiente.

As frações do ejaculado colhidas foram a primeira, a segunda (fração espermática) e parte da terceira fração. O restante da terceira fração foi colhido em outro recipiente, até o término completo da ejaculação.

Imediatamente após a coleta, foram avaliadas a coloração e viscosidade segundo KRAUSE (1966), e registrados o volume, o pH, a concentração, a motilidade

⁵ Canil Três Pinheiros: Piraquara-PR

⁶ Níveis de garantia: proteína bruta – 27%; energia bruta – 16%; fibras totais – 2,4%; umidade – 10%; cálcio – 0,8%; fósforo – 0,65%.

e o vigor espermático. O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen, no tubo de centrífuga graduado, e registrado em mililitros (ml).

A medida da concentração espermática foi realizada em câmara de Toma Nova, utilizando-se sêmen diluído na proporção de 0,05ml de sêmen para 10 ml de solução de formol à 10%. O número total de espermatozóides no ejaculado foi obtido multiplicando-se o volume de sêmen ejaculado, pela concentração espermática por mililitro.

Uma gota de sêmen foi colocada em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula de vidro, ambas mantidas à temperatura de 37°C, em placa aquecedora, para a observação da motilidade progressiva dos espermatozóides, realizada em microscopia óptica, em aumento de 400 vezes, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (vigor) foi também realizada em microscopia óptica, em aumento de 400 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente (CBRA, 1998).

A porcentagem de patologias espermáticas e a integridade de acrossoma foram avaliadas adicionando-se 1 a 3 gotas de sêmen em solução de formol-salina tamponada e análise em câmara úmida, em microscopia ótica de contraste de fase, com aumento de 1000 vezes (HANCOCK, 1957).

Após a avaliação, o sêmen obtido de cada ejaculado foi dividido em duas frações iguais, sendo cada uma delas diluída com meio à base de leite desnatado e glicose (KENNEY et al., 1975), na proporção de 1:1 (CUNHA e LOPES, 1999). As amostras foram centrifugadas em 3750 rpm durante 10 minutos para a retirada do líquido seminal e padronização das amostras.

Após a centrifugação e retirada do sobrenadante, cada uma das frações foi diluída nos meios testados Tris-gema-SDS⁷, contendo 0,5% de sódio dodecil sulfato (ROTA et al., 1997), e Tris-leite (tabela 1). A proporção de diluente adicionada foi o

⁷ Tris-gema-sódio dodecil sulfato (Equex STM paste®).

suficiente para que fosse alcançada a concentração de 200 milhões de espermatozóides por mililitro.

Foi realizada uma nova avaliação de motilidade e vigor após um período de adaptação de 10 minutos.

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DILUIDORES TRIS-GEMA-SDS E TRIS-LEITE

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DILUIDORES	TRIS-GEMA-SDS*	TRIS- -LEITE
Tris (g) (Tris-hidroximetilaminometano)	2,24	2,24
Ác. Cítrico (g)	1,152	1,152
Glucose (g)	0,96	0,96
Glicerol %	6	6
Gema de ovo %	20	--
Leite desnatado %	--	20
Equex STM Paste %	0,5	--
Água bidestilada (qsp/ml)	100	100

* ROTA *et al.* (1997).

O sêmen foi envasado, imediatamente após o período de adaptação, em palhetas de acetato de polietileno de 0,5 ml e permaneceu por 2 horas em geladeira, a 5°C, para resfriamento e equilíbrio.

Durante a preparação do sêmen para a crioconservação, o mesmo foi mantido em temperatura ambiente.

Todo o processamento inicial do sêmen expendeu, no máximo, 40 minutos até que o sêmen fosse submetido ao resfriamento.

A congelação foi realizada em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas, que estavam em equilíbrio a 5°C, em uma grade posicionada 3 cm acima do nível de nitrogênio líquido.

O sêmen foi pré-congelado, durante 10 minutos, no vapor de nitrogênio líquido, e após esse período as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio para a

congelamento final do sêmen. Logo após, as palhetas foram colocadas em *canister* apropriado e armazenadas em botijão com nitrogênio líquido. O sêmen foi mantido criopreservado, até o momento de sua utilização.

A descongelamento do sêmen foi realizada em banho-maria a 38°C, por 45 segundos. Logo após o sêmen foi retirado das palhetas e transferido para tubos de ensaio pré-aquecidos, onde foram mantidos incubados a 38°C, para serem avaliados. A descongelamento foi feita entre um a dois meses após a congelamento.

As amostras de sêmen foram avaliadas logo após o descongelamento quanto a motilidade, e integridade de acrossoma, conforme a metodologia previamente descrita.

Classificaram-se os espermatozoides quanto à integridade ou não do acrossoma, incluindo desde edema e desprendimento até ausência de acrossoma.

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada nas amostras de sêmen, por meio do teste de termo-resistência. O teste consistiu em colocar o sêmen descongelado em tubos de ensaio, em banho-maria a 38°C. As amostras foram submetidas à incubação durante 180 minutos e neste período foram avaliadas quanto à motilidade e o vigor espermáticos aos 30, 60, 120 e 180 minutos. Após o término do teste de termo-resistência foi novamente avaliada a integridade de acrossoma.

3.2 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

O delineamento estatístico adotado foi o de blocos ao acaso com dezoito repetições cada. As análises estatísticas incluíram a análise do coeficiente de variação e o teste de significância com a distribuição do tipo “t”. As médias foram comparadas através do teste “t-pareado”, com 5% de probabilidade de erro.

O coeficiente de variação foi definido pela razão entre o desvio padrão da amostra e a sua média, em porcentagem.

4 RESULTADOS

Na tabela 2 são apresentados os resultados das características seminais dos animais incluídos neste experimento.

Pode-se observar que as características seminais estavam condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie canina. Considerou-se, portanto, que os animais estavam em condições de serem doadores de sêmen para o experimento.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DOS CÃES DA RAÇA DACHSHUND, UTILIZADOS COMO DOADORES DE SÊMEN, CANIL TRÊS PINHEIROS, PIRAQUARA-PR, PERÍODO DE ABRIL A JUNHO DE 2001.

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS	ANIMAIS		
	Cão 01	Cão 02	Cão 03
Volume (ml)	2,16 ± 0,27	4 ± 0,42	2,85 ± 0,28
Motilidade (%)	87,5 ± 4,18	87,5 ± 4,18	86,67 ± 2,58
Vigor (0-5)	3,5 ± 0,54	3,66 ± 0,51	3,5 ± 0,54
Concentração (sptz/ejaculado)	440 ± 50,26	571,5 ± 74,65	320,5 ± 51,29
Morfologia			
Defeitos menores (%)	11,83 ± 1,47	11,5 ± 1,37	11,16 ± 1,47
Defeitos maiores (%)	5,5 ± 1,05	7,66 ± 1,03	4,5 ± 1,04
Defeitos totais	17,33 ± 1,57	19,17 ± 2,14	15,67 ± 1,57

Conforme pode-se observar nas tabelas a seguir, em algumas fases do processamento do sêmen foram observadas diferenças significativas entre os dois diluentes propostos, na sua capacidade de preservar a viabilidade celular.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na motilidade progressiva dos espermatozoides após a centrifugação das amostras no diluente Kenney e posterior diluição com os meios testados, como se pode observar na tabela 3.

Logo após o resfriamento do sêmen diluído, pode-se observar uma diminuição nas médias da motilidade progressiva, em ambas as amostras. Entretanto, tal diminuição foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) entre os diluidores testados, evidenciando já nesta etapa uma menor capacidade de manutenção da motilidade espermática do diluidor Tris-leite (tabela 3).

TABELA 3 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (%) EM SÊMEN CANINO DILUIDO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E RESFRIAMENTO

FASE DO PROCESSAMENTO	DILUIDOR	X*	S	t	
				Valor	Probabilidade
Pós-centrifugação	Tris-leite	80,6 ^a	5,4	-0,8086	0,4299
	Tris-gema-SDS	81,1 ^a	4,0		
Pós-resfriamento	Tris-leite	67,8 ^a	10,9	-4,6532	0,0002
	Tris-gema-SDS	73,9 ^b	7,2		

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste t – pareado.

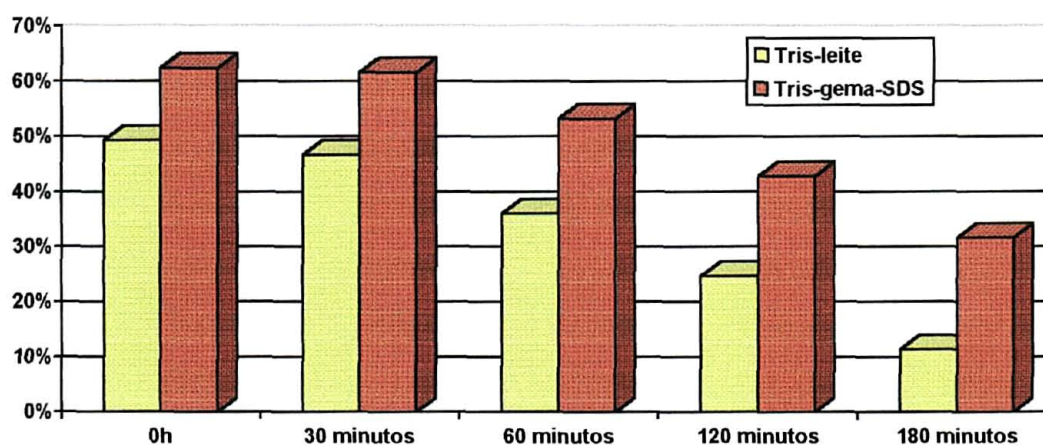
Imediatamente após a descongelação das amostras de sêmen, a motilidade espermática foi significativamente maior com o diluidor Tris-gema-SDS, quando comparado ao diluidor Tris-leite ($P<0,05$). Tal diferença pode também ser observada durante todo o período do teste de termo-resistência, o que denota neste experimento a relativa superioridade do diluidor Tris-gema-SDS, em relação ao diluidor Tris-leite, na manutenção da motilidade espermática, como pode-se observar na tabela 4 e na figura 1.

TABELA 4 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE t, DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (%) EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E DURANTE O TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	DILUIDOR	X *	S	t	
				Valor	Probabilidade
0 minutos	Tris-leite	49,4 ^a	12,7	-5,3726	0,0001
	Tris-gema-SDS	62,5 ^b	6,7		
30 minutos	Tris-leite	46,7 ^a	13,6	-5,3011	0,0001
	Tris-gema-SDS	61,7 ^b	6,4		
60 minutos	Tris-leite	36,1 ^a	15,4	-5,3583	0,0001
	Tris-gema-SDS	53,3 ^b	5,9		
120 minutos	Tris-leite	24,7 ^a	14,5	-7,2327	0,0000
	Tris-gema-SDS	42,8 ^b	12,3		
180 minutos	Tris-leite	11,4 ^a	10,5	-10,5821	0,0000
	Tris-gema-SDS	31,7 ^b	12,9		

*As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste t – pareado.

FIGURA 1 – MOTILIDADE PROGRESSIVA (%) IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E DURANTE O TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA EM SÊMEN CANINO DILUIDO



Com relação às patologias espermáticas, não foram observadas alterações no número de células com defeitos primários, durante a criopreservação (tabela 5).

TABELA 5 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE t, DA PATOLOGIA ESPERMÁTICA PRIMÁRIA EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	DILUENTES	PATOLOGIAS PRIMÁRIAS			
		X*	S	t	
				valor	Probabilidade
0 minutos	Tris-leite	6,3 ^a	1,1	0,4964	0,6260
	Tris-gema-SDS	6,2 ^a	1,6		
180 minutos	Tris-leite	7,1 ^a	1,5	-0,9397	0,3605
	Tris-gema-SDS	7,3 ^a	1,4		

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo Teste t – pareado.

No entanto, foi constatado um grande aumento nas patologias espermáticas secundárias quando comparou-se a amostra espermática fresca e as amostras diluídas, congeladas e descongeladas em ambos os diluentes, como pode-se observar na tabela 6.

TABELA 6 – VALORES MÉDIOS DE PATOLOGIA ESPERMÁTICA SECUNDÁRIA EM SÊMEN CANINO FRESCO NÃO DILUIDO E EM AMOSTRAS DILUÍDAS, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

SÊMEN FRESCO	FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	TRIS-LEITE	TRIS-GEMA-SDS
11,5	0 minutos	44±5,5	39,9±3,4
	180 minutos	51,6±5,5	46,2±4,6

O aumento nas patologias espermáticas secundárias foi observado também ao final do teste de termo-resistência. Entretanto, tal aumento foi diferente ($p<0,05$) entre os dois diluidores testados. Como se observa na tabela 7, logo após a descongelação do sêmen, observou-se que o diluente Tris-gema-SDS conferiu uma maior proteção das células durante a criopreservação resultando em um menor número de patologias secundárias.

TABELA 7 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE t, DA PATOLOGIA ESPERMÁTICA SECUNDÁRIA EM SÊMEN CANINO DILUIDO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	DILUENTES	X*	S	t	
				Valor	Probabilidade
0 minutos	Tris-leite	44 ^a	5,5	5,4242	0,0000
	Tris-gema-SDS	39,9 ^b	3,4		
180 minutos	Tris-leite	51,6 ^a	5,5	6,4701	0,0000
	Tris-gema-SDS	46,2 ^b	4,6		

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste t – pareado.

A maior capacidade de proteção do diluente Tris-gema-SDS foi verificada também durante o teste de termo-resistência, onde diferença entre eles ($p<0,05$) foi mantida, embora o aumento das patologias secundárias tenha ocorrido em ambos os diluentes (tabela 7).

O grande aumento das patologias espermáticas secundárias totais foi em decorrência, principalmente, do aumento das lesões de acrossoma.

As lesões que ocorreram com maior frequência foram edemaciamento severo, desprendimento parcial e até perda total do acrossoma (figuras 2 e 3).

FIGURA 2 – EDEMA SEVERO DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO APÓS DESCONGELAMENTO, EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE, AUMENTO DE 1000X.

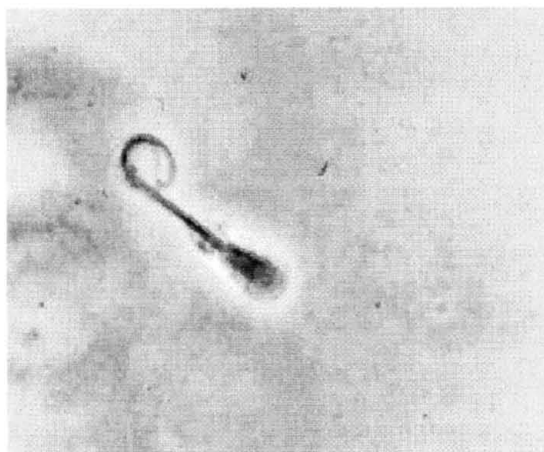
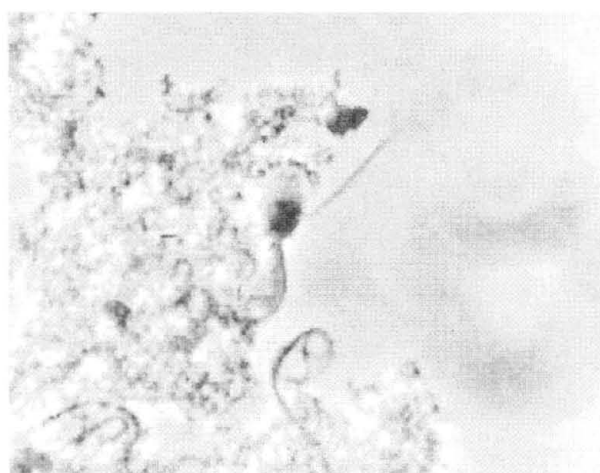


FIGURA 3 – DELOCAMENTO TOTAL DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO APÓS DESCONGELAMENTO, EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE, AUMENTO DE 1000X.



A avaliação da integridade acrossômica dos espermatozóides revelou que houve diferença ($P < 0,05$) entre os diferentes tratamentos após a congelação e descongelação do sêmen. Novamente observou-se que o diluidor Tris-gema-SDS apresentou melhores resultados, com valores mais elevados de células com acrossoma intacto quando comparado ao diluidor Tris-leite, como se pode notar na tabela 8.

TABELA 8 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E VALORES DE T, REFENTES À INTEGRIDADE DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO FRESCO, IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO E AO FINAL DO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	DILUENTES	INTEGRIDADE DE ACROSSOMA			
		X*	S	t	
				valor	probabilidade
fresco	—	96,3	1,75		
0 minutos	Tris-leite	65 ^a	4,4	-5,0364	0,0003
	Tris-gema-SDS	68,3 ^b	3,1		
180 minutos	Tris-leite	59,2 ^a	4,9	-6,1484	0,0000
	Tris-gema-SDS	63,3 ^b	4,4		

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo Teste t – pareado.

Ainda na tabela 8, pode-se observar ainda que o aumento das patologias secundárias ao final do teste de termo-resistência foi também em decorrência do aumento do número de células que apresentavam lesões de acrossoma em ambos os tratamentos, embora o diluidor Tris-gema-SDS tenha mantido a melhor capacidade de manter a integridade acrossômica, mantendo a diferença ($p < 0,05$) quando comparado ao diluidor Tris-leite.

Pode-se verificar um aumento gradativo do coeficiente de variação relacionado às variáveis motilidade progressiva e integridade de acrossoma, em ambos os diluentes, durante todas as etapas do processamento que foram avaliadas, como observa-se nas tabela 9, 10 e 11. No entanto, no diluidor Tris-gema-SDS o aumento nos coeficientes de variação ocorreu mais suavemente que o diluidor Tris-leite.

TABELA 9 – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA MOTILIDADE PROGRESSIVA EM AMOSTRAS DE SÊMEN CANINO, APÓS DILUIÇÃO, CENTRIFUGAÇÃO E RESFRIAMENTO

FASE DO PROCESSAMENTO	DILUENTE	COEFICIENTE VARIAÇÃO
Sêmen fresco	—	4%
Pós-centrifugação	Tris-leite	6,7%
	Tris-gema-SDS	4,9%
Pós-geladeira	Tris-leite	16%
	Tris-gema-SDS	9,7%

Ao final do teste de termo-resistência as amostras diluídas com o diluidor Tris-leite apresentaram uma elevação acentuada no coeficiente de variação referente à motilidade progressiva, onde observou-se uma variação de 92,6%, conforme pode-se observar na tabela 10.

TABELA 10 – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA MOTILIDADE PROGRESSIVA EM SÊMEN CANINO PÓS-DESCONGELAMENTO

FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	DILUENTE	COEFICIENTE VARIAÇÃO
0 minutos	Tris-leite	25,7%
	Tris-gema-SDS	10,7%
30 minutos	Tris-leite	29,2%
	Tris-gema-SDS	10,4%
60 minutos	Tris-leite	42,62%
	Tris-gema-SDS	11,1%
120 minutos	Tris-leite	58,6%
	Tris-gema-SDS	28,7%
180 minutos	Tris-leite	92,6%
	Tris-gema-SDS	40,9%

O aumento no coeficiente de variação referente à característica integridade de acrossoma foi menos acentuado que o aumento referente à motilidade progressiva.

Ambos os diluentes apresentaram aumento nos coeficientes de variação, entretanto o meio Tris-gema-SDS obteve o menor índice logo após o descongelamento e ao final do teste de termo-resistência (tabela 11).

TABELA 11 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE ACROSSOMA EM SÊMEN CANINO PÓS-DESCONGELAMENTO

FASE DO PROCESSAMENTO (minutos)	DILUENTE	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
Fresco	—	1,8%
0 minutos	Tris-leite	6,7%
	Tris-gema-SDS	4,5%
180 minutos	Tris-leite	8,3%
	Tris-gema-SDS	6,9%

5 DISCUSSÃO

Todos os animais que participaram deste experimento se encontravam dentro dos limites considerados normais para a espécie canina (SEAGER, 1986; JOHNSTON, 1991; LINDE-FORSBERG, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996), sendo, portanto, considerados aptos a serem doadores de sêmen.

5.1 MOTILIDADE PROGRESSIVA

Os valores obtidos de motilidade progressiva do sêmen, neste experimento, logo após a descongelação foram semelhantes aos de SILVA e VERSTEGEN (1995), WILSON (1993) e STROM et al. (1997), sendo que esses autores utilizaram diferentes diluidores e diferentes concentrações de glicerol nos meios.

No entanto, os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por OLAR et al. (1989), THOMAS et al. (1993) e DOBRINSKI et al. (1993), que encontraram motilidade espermática, após a descongelação, em torno de 27%, enquanto a motilidade média dos espermatozóides, nos diluidores Tris-gema-SDS e Tris-leite, foi de aproximadamente 62% e 50%, respectivamente, logo após o descongelamento. Os autores citados utilizaram protocolos distintos de congelação, com diferentes concentrações de glicerol no diluidor (OLAR et al., 1989), diferentes métodos de envasamento do sêmen (THOMAS et al., 1993) e diferentes taxas de congelação (DOBRINSKI et al., 1993).

Considerando-se o diluidor Tris-gema-SDS, esse tem sido empregado em diversos trabalhos, com resultados próximos aos observados no presente experimento, quanto a motilidade progressiva (ROTA et al., 1997; ROTA et al., 1999; PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000b).

Diluidores contendo leite desnatado têm sido empregados em experimentos de criopreservação na espécie caprina (BARBOSA et al., 1999) e equina (PICKETT e AMMAN, 1987; BRAUN et al., 1995) com resultados satisfatórios.

5.2 PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS

Na avaliação das patologias espermáticas, as amostras diluídas em meio Tris-gema-Equex demonstraram a maior capacidade deste em proteger a célula espermática, embora as amostras diluídas em ambos os diluentes tenham tido um aumento significativo nas patologias espermáticas secundárias induzidas pela crioconservação.

Tal aumento das patologias secundárias totais nas células espermáticas foi em consequência, principalmente, do aumento das lesões nos acrossomas espermáticos. Segundo CROSS e MEIZEL (1989), as membranas acrossomais podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen, o que foi observado após o descongelamento, quando a porcentagem de acrossomas íntegros decresceu em cerca de 30%, se comparada às porcentagens obtidas no sêmen fresco. Parece que os espermatozóides, por terem sido submetidos a uma diminuição de temperatura, tornam-se mais predispostos a alterações de acrossoma, devido à ocorrência de choque térmico, que de modo geral afeta todas as membranas espermáticas, inclusive a acrossomal (WATSON, 1995).

Adicionalmente, OETTLÉ (1986) ressaltou que uma quantidade considerável de espermatozóides sofre lesões durante o resfriamento e equilíbrio do sêmen. Com isso, torna-se importante a otimização do processamento inicial do sêmen, pois está claro que, quanto mais alta a porcentagem de espermatozóides com acrossomas íntegros antes da congelação, maior a população espermática viável e com potencial de sobrevivência após o processamento.

As lesões de acrossoma mais freqüentes induzidas pelo congelamento foram também as mais graves, como edemaciamento severo, desprendimento e até perda total do acrossoma. OETTLÉ (1986) e STROM et al. (1997) relataram que durante o processamento do sêmen, a criopreservação é responsável pelo aparecimento de lesões severas nos acrossomas.

Mesmo havendo muitas alterações de acrossoma após a criopreservação, os valores apresentados estão bastante próximos dos encontrados por OETTLÉ (1986), ENGLAND e PONZIO (1996), STROM et al. (1997), PEÑA et al. (1998a), PEÑA et al. (1998b) e ROTA (1998) e foram superiores aos obtidos por IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) e HAY et al. (1997). Sendo que, no experimento conduzido por HAY et al. (1997) foram utilizadas cinco taxas diferentes de congelação, desde taxas lentas até muito rápidas, que podem ter causado maiores danos de acrossoma e ser responsável por esse resultado inferior. Enquanto IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) congelaram o sêmen em *pellets*, o que pode ter sido responsável por essas diferenças nos resultados.

5.3 TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

5.3.1 Motilidade espermática

Os resultados do teste de termo-resistência evidenciaram que houve uma queda acentuada na motilidade progressiva, nas amostras de sêmen resfriado, congelado em ambos os diluentes e ao longo das três horas de duração do teste. Tal resultado demonstra que os espermatozóides, após serem submetidos a mudanças de temperatura, apresentam menor longevidade.

O resultado da motilidade progressiva durante o teste de termo-resistência do sêmen criopreservado com Tris-gema-SDS foi semelhante ao encontrado por HAY et al. (1997), que relataram motilidade espermática entre 30 a 50%, após duas horas de incubação do sêmen diluído em meio Tris-citrato-gema de ovo. No entanto, PEÑA et al. (1998a) e PEÑA et al. (1998b) obtiveram resultados inferiores aos observados no presente experimento. Estes autores relataram motilidade espermática de cerca de 15%, após duas horas de incubação do sêmen a 38°C, sendo que os primeiros utilizaram em amostras diluídas em meio Tris-citrato-gema de ovo acrescido de aminoácidos e os segundos, com diferentes concentrações de glicerol.

PEÑA et al., (1998) encontraram valores para motilidade espermática em torno de 15% após congelação do sêmen em meio contendo sódio dodecil sulfato e incubação durante 2 horas a 39°C. Estes pesquisadores utilizaram concentrações de glicerol e sódio dodecil sulfato de 8% e 0,25%, respectivamente.

Os resultados de motilidade espermática obtidos durante o teste de termo-resistência utilizando o Tris-gema-SDS foram semelhantes aos encontrados por ROTA et al. (1997) e PEÑA e LINDE-FORSBERG (2000), que relataram cerca de 40% após três horas de incubação a 38°C em sêmen diluído em Tris-glucose-gema adicionado de sódio dodecil sulfato, com concentrações de glicerol e sódio dodecil sulfato semelhantes as utilizadas no presente experimento.

Mesmo havendo resultados semelhantes na literatura, os valores encontrados para motilidade progressiva, ao final do teste de termo-resistência, foram baixos. Segundo ROTA et al. (1999), um dos fatores que limita a fertilidade do sêmen criopreservado, na espécie canina, é o curto período de sobrevivência dos espermatozóides, após a descongelação. Essa limitada sobrevivência, pode ser reflexo de lesões causadas pela congelação e descongelação, como alterações da organização da membrana plasmática ou função mitocondrial ou danos a outras organelas.

No entanto, esses mesmos autores utilizaram sêmen para inseminação artificial em cadelas que havia sido testado em teste de termo-resistência e obtido 17% de motilidade espermática, após duas horas de teste. A taxa de prenhez alcançada foi de 84%, considerada alta para a espécie. Acredita-se, portanto, que em condições *in*

vivo, mesmo os espermatozóides que apresentam baixa motilidade, possam interagir no trato reprodutor feminino com fatores que influenciem, positivamente, sua longevidade.

Não foram encontrados estudos que relatem resultados de testes *in vitro* utilizando o tampão Tris contendo leite desnatado na espécie canina.

5.3.2 Integridade de acrossoma

O diluidor Tris-gema-Equex apresentou também melhores resultados na manutenção da integridade de acrossoma. Tal melhora na capacidade de manutenção da integridade de membrana pode ter sido devido à presença do sódio dodecil sulfato agindo também como crioprotetor, interagindo com a gema do ovo e protegendo contra as possíveis lesões ocorridas durante o congelamento (ROTA et al., 1997).

Foi observado que as amostras de sêmen diluídas em ambos os diluentes apresentaram uma diminuição de aproximadamente 10% no número de células com o acrossoma intacto durante as duas horas do período do teste de termo-resistência. Tal diminuição deve-se provavelmente aos danos latentes ocorridos durante o congelamento e descongelamento e que tornam-se evidentes durante a incubação a 38°C. ROTA et al. (1997) observaram uma diminuição de 25% durante três horas de incubação a 38°C enquanto PEÑA et al. (1998) encontraram uma diminuição de 60% após 4 horas de teste de termo-resistência a 39°C.

5.4 VARIAÇÃO INDIVIDUAL

Apesar de ter sido verificado variação individual entre machos em outras espécies domésticas, quanto a resistência do sêmen ao resfriamento e ao congelamento, poucos estudos abordaram esse fato na espécie canina. Entretanto,

DAVIES⁸ citado por ENGLAND (1993) observou que um empecilho para a utilização de sêmen criopreservado nessa espécie, seria uma evidente variação individual, entre os cães, quanto à sobrevivência do espermatozóide, após a descongelação do sêmen.

Pôde-se verificar um aumento no coeficiente de variação referente a variável motilidade progressiva já após o resfriamento do sêmen. A elevação tornou-se maior após a congelação e descongelação do sêmen, indicando variações quanto a congelabilidade do sêmen entre os machos utilizados, ou seja, existiram animais que apresentaram uma menor resistência do sêmen durante o teste de termo-resistência do que outros, semelhante ao relatado por DAVIES⁸ citado por ENGLAND (1993).

Uma diferença quanto à resistência do sêmen entre os animais foi evidenciada durante o teste de termo-resistência nos momentos de 30, 60, 120 e 180 minutos, quando o aumento no coeficiente de variação foi bastante acentuado para o diluidor Tris-leite, enquanto o diluidor Tris-gema-SDS apresentou uma alteração menor. Esse resultado demonstra que a variação individual quanto a congelabilidade do sêmen pode ser amenizada pelo uso de um diluente que forneça maior proteção ao sêmen.

Os resultados sugerem que a análise do sêmen somente após o seu processamento, sem observações subseqüentes, não evidenciaria essa diferença entre os cães quanto à resistência do sêmen, salientando-se assim, a importância da realização do teste.

5.4 VARIAÇÃO ENTRE OS MEIOS DILUIDORES

O diluidor Tris-gema-SDS apresentou resultados superiores com relação ao diluidor Tris-leite em todos os testes que avaliam a viabilidade das células espermáticas. Isso demonstra uma superioridade desse diluidor em conferir melhor

⁸ DAVIES, P.R. A study of spermatogenesis, rates of sperm production and methods of preserving the semen of dogs. Australia, 1982. Tese de *phd* – Universidade de Sidney.

proteção ao espermatozóide, quando comparado ao Tris-leite. Indicando que os espermatozóides que estão mais bem protegidos por um meio diluidor apresentam maior longevidade.

Os dois meios testados diferiram em suas formulações, principalmente, quanto à presença do detergente Equex STM Paste®, sendo que o meio Tris-gema foi o único que o possuía em sua formulação e foi o diluidor que apresentou os melhores resultados.

O emprego do detergente sódio dodecil sulfato tem sido apontado como um agente crioprotetor de importância na conservação de sêmen canino, promovendo um maior número de células móveis e viáveis após a descongelação (ROTA et al., 1997; PEÑA et al., 1998; ROTA et al., 1999; PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000). Tal capacidade de criopreservação já se tornou evidente no resfriamento do sêmen, durante o qual as amostras diluídas em Tris-gema-SDS mantiveram uma maior porcentagem de espermatozóides móveis.

Segundo PEÑA e LINDE-FORSBERG (2000), a natureza do efeito benéfico do Equex STM Paste sobre a membrana plasmática durante a congelação não é completamente entendida. Acredita-se que o sódio dodecil sulfato exerça um efeito indireto, através do meio extracelular, modificando a estrutura terciária das lipoproteínas da gema do ovo (PURSEL et al., 1978; ARRIOLA e FOOTE, 1987).

ARRIOLA e FOOTE (1987), observaram que quando espermatozóides bovinos eram congelados na presença de Equex, eles se tornavam menos susceptíveis aos choques osmóticos induzidos pela adição do glicerol ao meio e PEÑA e LINDE-FORSBERG (2000), concluem que a adição de sódio dodecil sulfato ao meio aumenta a termo-resistência.

Os meios diluidores diferiram também em sua composição quanto à presença da gema de ovo ou leite desnatado agindo sobre a membrana plasmática e suportando a sobrevivência espermática durante a crioconservação. A gema de ovo tem sido apontada como um protetor da membrana plasmática dos choques de

temperatura e é regularmente adicionada aos diluentes de diferentes espécies (QUINN et al., 1980; WATSON, 1995). Segundo BLACKSHAW (1954) os diluidores devem ser constituídos de gema de ovo ou leite desnatado, pois se sabe que tais diluidores quando adicionados ao sêmen, após a retirada do plasma seminal, exercem uma proteção efetiva contra o choque térmico, através do mecanismo de fusão da vesícula fosfolipídica com a membrana plasmática. Segundo BARBOSA et al. (1999) o leite tem efeito crioprotetor por ação da caseína, a fosfoproteína presente no leite, sobre as membranas plasmáticas.

A presença do sódio dodecil sulfato no meio Tris-gema pode ter sido o fator diferencial entre os dois meio diluidores, pois meios contendo apenas leite desnatado ou gema de ovo sem sódio dodecil sulfato têm sido utilizados em estudos na espécie equina, com resultados semelhantes entre si (BRAUN et al., 1995).

Pelos resultados dos testes, observou-se que o meio diluidor Tris-gema-SDS foi superior ao meio Tris-leite desnatado para a criopreservação de sêmen canino, nessas condições experimentais. Pois em todos os testes sobre a qualidade espermática, após a congelação, as amostras de sêmen submetidas ao meio Tris-gema-SDS obtiveram médias significativamente maiores que as amostras submetidas ao meio Tris-leite. Este fato pode ser atribuído à presença de mais um crioprotetor atuando na proteção da membrana plasmática e acrossomal.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste experimento de avaliação do uso de dois meios diluidores, Tris-leite e Tris-gema-SDS, na crioconservação do sêmen do cão foram:

- O diluidor Tris-gema-SDS proporcionou valores mais altos de motilidade progressiva no sêmen pós-resfriamento e pós-descongelamento.
- O diluidor Tris-gema-SDS manteve uma maior taxa de motilidade progressiva durante o teste de termo-resistência.
- O diluidor Tris-gema-SDS obteve também melhores resultados de integridade de acrossoma no sêmen pós-descongelamento

REFERÊNCIAS

ALLER, J.F.; ALBERIO, R.H.; IOVANNITTI, B.; CABODEVILA, J. Criopreseervación de embriões mamíferos 1ª. Parte: Características generales de la congelación. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.76, p.132-136, 1995.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predict accurately? **Journal of Andrology**, v.10, p.89-98, 1989.

AMANN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, p.397-406, 1993.

ANDERSEN, K. Fertility of frozen dog semen. **Acta Veterinary Scandinavia**, v.13, p.128-130, 1972.

ARRIOLA, J., FOOTE, R. H. Glicerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1664-1670, 1987.

BARBOSA, L.P.; GUIMARÃES, J.D.; ESPESCHIDT, C.J.B.; TORRES, C.A.A.; SANTOS, A.B.F. Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial de cabras alpinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.283-285, 1999.

BARTLLET, D.J. Studies on dog semen. II. Biochemical characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.3, p.190-250, 1962.

BLACKSHAW, A.W. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. **Australian Veterinary Science**, v.7, p.573-582, 1954.

BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SATO, K.; TORRES-BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Criobiology**, v.32, p.487-492, 1995.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2^a. Ed. Belo Horizonte: 1998. 49p.

CROSS, N.L., MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v.41, p.635-641, 1989.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.306-308, 1999.

DOBRINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A.D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.291-296, 1993.

DOEBBLER, G.F. Crioprotective compounds – review and discussion of structure and function. **Criobiology**, v.3, p.2-11, 1966.

ELLINGTON, J.; SCARLETT, J.; MEYERS-VALLEN, V.; MOHAMMED, H.O.; SORMAN, V. Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. **Theriogenology**, v.40, p.725-733, 1993.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog sêmen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.243-255, 1993.

ENGLAND, G.C.; ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p.373-381, 1992.

ENGLAND, G.C.W., PONZIO, P. Comparisons of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165-171, 1996.

ENGLAND, G.C.; ALLEN, W.E.; MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculates. **Research Veterinary Science**, v.49, p.66-70, 1990.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FARSTAD, W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. **Journal of Small Animal Practice**, v.25, p.561-565, 1984.

FARSTAD, W. Semen criopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1996. 785 p.

FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., FARSTAD, W., DOUGLAS, T.A. Insemination of beagle bitches with frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.39, p.293-298, 1989.

FONTBONNE, A., BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.325-327, 1993a.

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.531-532, 1993b.

FOOTE, R.H.; LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Veterinary**, v.54, p.78-89, 1964.

FOOTE, R.H. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog semen stored in buffered-yolk medium. **American Journal of Veterinary Research**, v.104, p.32-36, 1964.

GILL, H.P.; KANFRAN, C.F.; FOOTER, R.F.; KIRK, R.W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen -stored semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.1807-1813, 1970.

GRAHAM, E.F.; CRABO, B.G.; BROWN, K.I. Effect of some zwitter ion buffers on storage of spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.1-7, 1972.

GÜNZEL-APEL, A. -R., GÜNTER, C., TERHAER, P., BADER, H., Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.271-278, 1993.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.47-58, 1990.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Research Microscopy Society**, v.76, p. 84-97, 1957.

HARROP, A. E. **Mating: natural service and artificial insemination, in reproduction in the dog**. London, England, Baillière, Tindall & Cox, p.87-99, 1960.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.48, p.1329-1342, 1997.

IVANOVA-KICHEVA, M.G., SUBEV, M.S., BOBADOV, N.D., DACHEVA, D.P., ROUSEVA, I.A. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.563-569, 1995.

JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v.21, p.545-551, 1991.

JONHSTON, S.D.; KAMALPATANA, K.; ROOT-KUSTRITZ, M.V.; JONHSTON, V.R. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 405-415, 2000.

KENNEY, R.M.; BERGMANN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W.; Minimal contamination technique for breeding mares: technique and preliminary findings. **Proceedings, American Association Equine Practice**, v.21, p.327-366, 1975.

KRAUSE, D. **Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde**. Hannover, 1966. 165p. Tese livre docência. Tierärztliche Hochschule.

LAGARES, M.A.; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Manutenção da motilidade e funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide equino no sêmen resfriado com diferentes diluentes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.295-297, 1999.

LINDE-FORSBERG e FORSBERG. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 39, p. 299-310, 1989.

LINDE-FROSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v.21, p.467-485, 1991.

LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v.10, n.1, p.48-58, 1995.

MARTIN, J. C., KLUG, E., GUNZEL, A-R. Centrifugation of stallion semen and storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.27, p.47-51, 1979.

MELO, A.C.M.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluente para a congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal**, v.1, p.33-38, 1991.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1982, 783p.

MORTON, D.B. Review on the use of frozen semen in dog breeding. **Animal Technology**, v.37, n. 1, p. 67-71, 1986.

MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, criopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.39, p. 311-316, 1989.

MORRIS, G.J. Liposomes as a model system for investigating freezing injury. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. **Effects of Low Temperature on Biological Membranes**. London: Academic Press. p. 241-262, 1981.

OETTLÉ, E.E. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.145-150, 1986.

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.257-260. 1993.

OLAR, T. T., BOWEN, R. A., PICKETT, B. W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility on canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v.31, p. 451-461, 1989.

OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; FILHO, A.I.R. Avaliação de sêmen canino pós-descongelamento utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferentes períodos de equilíbrios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.308-309, 1999.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.703-718, 2000a.

PEÑA, A., LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000b.

PEÑA, A. I., BARRIO, F., QUINTELA, L. A., HERRADON, P.G., Effects of sodium dodecil sulphate on post-thaw dog sêmen quality during *in vitro* incubation at 39° C and 22° C. **Reproduction of Domestic Animal**, v.33, p.393-398, 1998a.

PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADÓN, P.G. Effect of different glicerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998b.

PEÑA, A. I., BARRIO, F., QUINTELA, L. A., HERRADON, P.G. Proline and glicine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animal**, v.33, p. 5-9, 1998c.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.5, p.289-302, 1987.

PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v.23, p.339-404, 1940.

PENFOLD, L. M., MOORE, H. D. M. A new method for cryo-preservation of mouse spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.131 – 134, 1993.

PURSEL, V. G., SCHULMAN, L. L., JOHNSON, L. A. Effect of Orvus ES Paste on acrossome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. **Journal of Animal Science**, v.47, p.198-202, 1978.

PURSWELL, B.J.; ALTHOUSE, G.C.; ROOT, M.V. guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. **Proceedings of Annual Meeting Society of Theriogenology**, p.174-181, 1992.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.60; p. 403-407, 1980.

ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa.** Uppsala, Suécia, 1997. 43p., Tese de doutorado – Departamento de obstetrícia e ginecologia, Universidade de ciências Agrônômicas.

ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANNOZZI, J ROMAGNOLI, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing-thawing rates. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 33, p.355-361, 1998.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog sêmen frozen in a tris extender with or without Equex STM Paste. **Theriogenology**, v.51, p.1045-1058, 1999.

ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. **Irish Veterinary Journal**, v.8, p.216-221, 1954.

SEAGER, S. W. J., Succesful pregnancies utilizing frozen dog semen. **AL Digest**, v.17, n.6 – 7, 1969.

SEAGER, S.W.J.; FLETCHER, W.S. Progress on the use of frozen semen in the dog. **Veterinary Record**, v. 92, p. 6-10, 1973.

SEAGER, S.W.J.; PLATZ, C.C. Artificial insemination and frozen semen in the dog. **Veterinary clinics of North America**, v. 7, p.757-764, 1977.

SEAGER, S.W.J.; PLATZ, C.C. Collection and evaluation of canine semen. **Veterinary Clinicians of North American**, v.7, p.765-773, 1977.

SEAGER, S.J., PLATZ, C.C., FLETCHER, W.S. Conception rates and related data using frozen dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.45, p.189-192, 1975.

SEAGER, S.J. Semen collection and evaluation in the dog. In: MORROW, A. (Ed.) **Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals**. Philadelphia: Saunders, 1986. p.539-541.

SILVA, L.D.M. Avanços na inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, 2001.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.571-579, 1995.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Efeito do tampão Tris, gema de ovo e glicerol na congelação do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n.4, p.194-201, 2000.

SIRIVAI DYAPONG, S.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.M.; COLENBRADER, B. Effect of sperm diluents on the acrosoma reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p.789-802, 2000.

STROM, B., ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.247-256, 1997.

THOMAS, P.G.A., LARSEN R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.40, p.1199-1205, 1993.

VAN DER BERG, L.; SOLIMAN, F.S. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on changes in composition and pH of buffer salt solution during freezing. **Cryobiology**, v.6, p.93-97, 1969.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, p. 871-891, 1995.

WILSON, M. S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, 1993, p.307-311.